

自家融解에 따른 肝細胞 Mitochondria의 超微形態學的 變化

경북대학교 의과대학 병리학교실

손 윤 경 · 권 일 훈 · 손 태 중

서 론

세포의 죽음은 질병에 대한 조직의 혼란 반응형태중의 하나로 이와 관련된 용어로는 괴사와 자가용해가 있다.

괴사란 생체내에서 일어나는 세포의 죽음에서의 형태학적 변화를 의미하며, 자가용해란 일단 개체로부터 분리된 조직의 변화나 혹은 이미 사망한 개체에서의 세포 죽음에 따르는 변화를 나타내는 용어이며 이때 전자는 세포의 죽음에 그 자신의 분해효소 뿐만 아니라 중성 백혈구를 주로하는 주변세포의 소화효소가 함께 작용되는 변화이며 후자 즉 자가용해시는 세포자신의 효소만이 관여한다는 점에서 이 두가지 용어는 세포가 죽음에 이르게 된다는 결과는 동일하나 죽음까지의 과정에 차이가 있다고¹⁻³⁾ 볼 수 있다.

정상 세포는 항상성을 유지하면서 그에게 필요되는 욕구를 충족하는 매우 안정된 상태에 있는 것으로 만일 외부의 자극이 강하게 작용하더라도 세포는 항상성을 유지하기 위해 주변환경에 적응하고자 노력하게 된다. 그러나 적응능력 한계 이상으로 외부자극이 강하거나 지속적이면 세포의 항상성이 유지되는 안정상태는 더 이상 지속될 수 없게 되며 이때부터는 세포의 상태라 한다. 이때 원인인자가 제거된 뒤 원래의 상태로 복귀할 수 있는 것을 가역적 상태라 하고 그렇지 못하고 계속 변성되어 결국 죽음으로 이르게 되는 과정을 비가역적 상태라 한다⁴⁾.

세포의 죽음에 대해 Majno 등⁵⁾은 세포가 본래의 정상적인 기능을 수행하는 모든 활동이 정지되는 시기로 정의하였으나, 오늘날 이 방면의 무수한 연구에도 불

구하고 죽음의 시점을 정확하게 형태학적, 생화학적으로 다른 현대 과학의 방법으로도 단정지을 수 없다.

세포의 죽음을 초래하는 비가역적인 상태의 기전에 대해 오래전부터 많은 이론과 가설들이 논의되어 왔으나⁶⁻¹⁵⁾ 근래 대두된 가설들을 종합하면 크게 두가지로 요약할 수 있다. 첫째는, ATP의 생성장애와 세포내 이온 불균형으로 인한 세포의 부피조절 장애가 주요 기전이라는 설^{4, 16-22)}과 둘째, 상기한 ATP의 고갈외에 이로 인한 원형질막 구조의 변화 및 calcium 이온의 세포내 축적이 주된 역할을 한다는 설²³⁻²⁵⁾이다. 이들의 공통점으로 mitochondria의 ATP 생성 장애가 세포의 상태, 특히 죽음에 이르게 되는 비가역적 상태에 있어 주된 역할을 함을 알 수 있다.

Mitochondria는 1850년대에 이미 세포질내 소립자로 그 존재가 광학현미경 하에서 발견된 것으로 세포내 소기관중 가장 먼저 알려진 구조물이다. Altman²⁶⁾은 19세기말 세포질내에서 세균과 모양과 크기가 비슷한 물질을 관찰하고 이를 "bioblast"라 명명하였다. 그리고 mitochondria라는 용어는 가는 실같은 물질이라는 의미로 Benda²⁷⁾에 의해 처음 사용되었으며 Michaelis²⁸⁾는 janus green을 이용한 초 생체 염색을 성공함으로써 20세기 초 그 존재가 생체내에서 증명될 수 있게 하였다. Mitochondria의 분리는 불완전하나 Benda와 Hoerr²⁹⁾에 의해 처음으로 시도되었으며 Hogeboom 등³⁰⁾에 의해 방법이 개선됨으로 완전한 mitochondria의 구조를 세포질로부터 분리할 수 있게 하였다. Claude³¹⁾는 succinate oxidase 및 cytochrome oxidase 등의 효소의 존재를 발견함으로써 생화학적으로 mitochondria를 분리하였으며 그이후 점차 mitochondria의 호흡과 관련된 효소들이 발견되었다. 이러한 여러연구는 생물학적 시료 처리방법의 개선으로 의학 및 생물학적 분야에 전자현미경이 사용되면서 Palade³²⁾

* 접수: 1985년 8월 10일

에 의해 그 미세구조가 밝혀 짐에 따라 이전의 광학현미경 및 생화학적 연구가 종합되고 서로의 연관성을 알게 되는 주요한 계기가 되었다.

이렇게 하여 구조가 밝혀지게 된 mitochondria는 세포에 따라 그 모양에 차이는 있으나 근본적으로 이중의 막구조를 하고 있는 소기관으로 각층은 세포의 표면을 구성하는 원형질막과 기본구조가 같은 성분으로 구성되어 있다. 외막은 세포질과의 경계를 이루며 내막은 외막과의 사이에 약 80 A의 간격을 두고 존재하며, 이것은 내부로 주름이 잡힌 모양을 하는데 이것이 cristae이며, 내막의 안쪽은 세포질상의 균질한 물질의 기질로 되어 있다. 기질내에는 500 A 가량의 소립자가 몇개씩 관찰되는데 이것이 기질내 과립이다.

Mitochondria의 효소분포는 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)에 관여하는 효소는 주로 내막 주변 특히 cristae 안에 존재하며 기질내에는 탄수화물 지방산등의 분해회로인 citric acid cycle에 관여하는 효소가 존재하는 것으로 밝혀졌다^{33,34}.

상기한 형태학적 및 생화학적 연구를 토대로 하면 세포가 생존하는데 mitochondria의 존재는 필수적이며 특히 뱀살상 상해에서 가장 먼저 나타나는 변화는 mitochondria의 기능 저하로 인한 ATP 합성의 저하라는 것은 이미 잘 알려져 있다. 따라서 자가용해의 형태학적 변화과정을 mitochondria를 중심으로 초미형태학적 검색을 해야 할 필요가 있으며, 이는 피사와 자가용해의 차이를 규명하는데에도 도움이 될 것이다.

그래서 저자는 대사가 왕성한 장기의 하나인 간조직을 개체에서 분리하여 시간에 따른 자가용해 현상 중 특히 mitochondria의 전자현미경적 관찰을 통해 세포상해에 대한 형태학적 변화과정과 그 기전의 일단을 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

1) 실험동물

체중 140~160 gm 정도의 Sprague-Dawley 계 숫쥐를 일정기간 사육한 후 건강이 양호하다고 인정되는 것을 골라 실험에 사용하였다.

실험방법 : 각 동물을 ether 마취 하에서 양와위로 고정하여 복부를 절개하고 간조직을 절제하였다.

2) 관찰방법

절제된 간조직은 얇은 절편을 만든 다음 각 절편을 37°C 무균 생리식염수에 방치하여 이를 10, 20, 30분

1, 3, 6, 12, 24시간 후에 각각 관찰하였다. 대조군은 동물을 도살한 후 30초 이내에 간조직을 고정시켜 관찰하였다.

광학현미경적 검색 : 간 조직편을 10% 중성 포르말린에 고정하여 파라핀에 포매한 후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 관찰하였다.

3) 전자현미경적 검색

간 조직편을 1 mm³로 세절한 후 2.5% glutaraldehyde 용액(0.1 M, phosphate buffer, pH 7.4, 4°C)에서 2시간 전고정 한 후 phosphate 완충용액(0.1 M, pH 7.4)에 수세하고, 1% OsO₄ 용액(0.1 M, phosphate buffer, pH 7.4)에 2시간 후고정을 하였다. 탈수는 계열 ethanol로 하였으며 칩투는 propylene oxide로 하였다. 포매는 Luft 방법³⁵에 의한 epon 혼합물로 하였으며 포매후 1 μm 두께로 박절하고 methylene blue로 염색하였다. 관찰 부위는 중심정맥주위의 간세포를 선택하였으며, Porter Blum MT-2 B형 ultramicrotome로 Du-pont diamond knife를 사용하여 두께 40~60 nm 정도의 초박절을 한 뒤 Reynolds 방법³⁶에 의한 uranyl acetate 및 lead citrate 이중염색을 하고 Hitachi H-600 전자현미경으로 관찰하였다

성 적

1) 광학현미경적 소견

대조군 : 간 조직은 소엽의 구조가 일정하게 배열되어 있었고 각각의 간세포는 크기와 모양이 균등하였다. 이들은 중심정맥에서 문맥주변부까지 방사상으로 일렬로 나열되었으며, 열과 열사이에 통양이 있었다. 통양은 거의 막혀진듯이 보였으며 간혹 kupffer 세포가 보였다. 각 세포는 둥근핵을 중앙에 가졌으며 세포막이 뚜렷한 정 사각형에 가까운 모양을 하였고 세포질은 세립자의 구조물이 균등하게 분포되어 있었다. 핵은 많은 수에서 핵소체의 존재를 관찰할 수 있었으며 염색질도 전반적으로 고르게 분포되어 있었다.

실험군 : 37°C 무균 생리식염수에서 10분 및 20분간 방치한 군에서는 대조군과 비교해서 큰 차이점이 없었다.

30분 군에서는 통양의 간격이 약간씩 넓어져 있었으나 간세포의 변화는 없었다.

1시간 군에서는 통양의 간격이 전반적으로 넓어지며 소수에서 세포질내에 미세한 공포가 형성된 것을 볼 수

있었다. 핵의 변화는 인정되지 않았다.

3시간 군에서는 동양의 간격이 좀더 넓어지며 세포질 내의 공포형성이 뚜렷해 졌다. 동양을 면한 세포막이 부분적으로 파괴되었으며 동양내에는 세포질의 물질로 보이는 무정형의 호산성물질이 있었다. 수개의 세포에서 핵의 외양이 굴곡되며 염색질이 불균등하게 농축되어 있었다. 핵 주변의 세포질은 clear space를 형성하였다.

6시간 군에서 동양의 간격은 더욱 확장되었으며 동양내에는 무정형의 호산성 물질들로 차 있었다. 동양을 면한 세포질의 파괴와 공포의 형성이 현저하였다. 핵은 pyknosis, karyorrhexis 및 karyolysis의 소견을 보였으며, 일련의 방사상으로 나열된 간세포 구조가 부분적으로 파괴되어 단독으로 떨어진 세포들이 간혹 나타났다.

12시간 및 24시간 군에서는 동양이 매우 확장되었고 상대적으로 간세포의 위축이 나타났으며 상기한 세포질 및 핵의 변화는 좀더 현저하였으나 약간의 부분적인 구조적 변화외에 소엽의 구조와 세포의 윤곽은 구별할 수 있는 정도로 유지되어 있었다.

2) 전자현미경적 소견

대조군 : 간 세포의 mitochondria는 cristae의 발달이 적은 대신 넓은 부위가 기질로 되어 있었고 외막 및 내막은 연속된 균일한 막구조로 그 사이의 간격은 일정하였다. cristae의 간격, 길이 등은 고르지 않았다. 기질은 세립자양의 전자밀도가 균일한 무구조의 양상을 나타내었고 3~4개의 고밀도의 기질내 과립이 관찰되었다.

실험군 : 10분간 37°C의 무균생리식염수에 방치한 군에서 mitochondria는 대조군과 비교해서 뚜렷한 차이점이 관찰되지 않았다. 20분 방치한 군에서는 일부 mitochondria에서 경미한 기질내 부종과 함께 기질내 과립이 소실된 것이 관찰되었다. 막구조나 cristae의 변화는 없었으며 크기의 증대도 관찰되지 않았다. 몇 개의 myelin figure가 관찰되었다. 세포질내에는 전반적인 부종과 함께 ER의 확장과 ribosome의 탈락이 관찰되었다.

30분에는 mitochondria의 기질내 부종이 경미한 정도로 전반에 걸쳐 나타났으며 기질내 과립은 거의 소실되고 간혹 한두개가 남아 있는 것이 관찰되었다. 기질의 전자밀도는 고르게 전반적으로 감소되어 있었다. 막구조의 파괴나 cristae의 증창은 보이지 않았다. 소수의 mitochondria에서 기질내에 무정형의 고밀도 침

착물이 관찰되었다. 고배율 소견에서 이 침착물은 주로 cristae 및 내막을 중심으로 아주 작은 세립자양의 물질이 모여있는 양상으로 나타났다. 세포질내 다른 구조물은 심한 부종과 함께 SER은 절단되거나 수포양 확장소견을 보이며 RER은 심한 확장은 나타내지 않았으나 ribosome의 탈락이 현저하였다. 핵의 이상은 발견되지 않았다.

1시간에는 막구조의 이상이 관찰되었다. 다수의 mitochondria에서 내막이 기질내부로 돌출되거나 부분적 단절을 보였으며 cristae는 수포양 확장을 보였다. 내막의 많은 부분이 소실되어 마치 단일막 구조처럼 보이는 것도 관찰되었다. 외막은 비교적 잘 유지되는 양상이었다. 이와함께 기질내 증창이 현저하여 지면서 기질의 전자밀도가 불균등하게 분포되고 전자밀도가 매우 감소되어 있었다. 30분에서 관찰된 무정형 고밀도 침착물이 관찰되었으며 이와 약간 다른 형태의 침착물이 같이 관찰되었다. 후자의 침착물은 30분군에서 보다 밀도가 훨씬 높으며 주변의 cristae나 내막과의 관련성이 크게 인정되지 않았다. 세포질내의 증창이 매우 현저하였으며 대부분의 ER은 수포양 변화를 보였고 glycogen particle은 거의 소실되었다.

3시간 및 6시간에는 1시간에서의 변화가 진행된 양상으로 막구조의 파괴가 현저해 지면서 외막 및 내막의 변성으로 mitochondria의 외양이 많이 굴곡되었다. 고밀도 침착물이 기질내 여러 곳에서 관찰되었으며 그 크기가 약간 증가된 것도 보였다. 세포질내의 구조물은 심한 수포양 변화를 보이는 ER외에 무정형의 세포질내 응고물이 관찰되었다.

12시간에는 이전의 실험군에서 관찰된 변화가 더 현저해졌다. 24시간에는 세포질내의 구조가 거의 다 파괴되었고 막성구조물이 엉겨 myelin figure를 만들었으며 세포질내에는 다수의 무정형의 고밀도 침착물이 관찰되었다. Mitochondria로 인정되는 구조물은 그 막이 단일막만으로 되어 있었고 cristae의 구조는 찾아볼 수 없었다. 기질로 생각되는 부위는 무구조의 공간으로 되어 있었고 소수의 고밀도 침착물이 관찰되었다.

고 찰

간 세포 상해에 대한 형태학적 및 생화학적 연구는 CCl₄ 투여³⁷⁻⁴⁰⁾, antioxidant 결핍유도⁴¹⁻⁴³⁾ 필수지방산 결핍식이 투여⁴⁴⁾, 그리고 ischemia 유발⁴⁵⁻⁴⁸⁾등의 다양한 조건하에서 연구되어 왔으며 이들 연구에서 공

통적으로 mitochondria의 변화가 세포의 상해에 상당히 밀접한 관련성이 있음을 시사하였고 세포의 비가역적인 상해에 대한 많은 연구에서 mitochondria의 비가역적인 상해가 곧 세포의 죽음으로 가게 되는 중요한 기전이라고 설명하였다^{4, 16, 23, 24, 25}. Ischemia에 의한 mitochondria의 변화에 대해서는 여러 학자들^{21, 22, 47, 48}에 의해 밀도있게 연구되어 졌으며 초기 변화로 기질내 과립의 소실과 기질의 부종이 생긴다는 것은 이미 알려진 사실이다.

상기한 문헌적 지견을 토대로 저자들이 간조직의 자가용해를 유도하여 관찰한 바의 소견을 요약하면 우선 광학현미경으로는 37°C 생리식염수에 1시간동안 방치한 후부터 세포질내 미세한 공포가 형성되기 시작하였으며 막의 파괴는 3시간 이후에 관찰되었다. 그러나 24시간 근까지도 세포의 전체적인 구조는 배열이나 모양이 크게 파괴되지 않고 잘 유지된 상으로 나타났다. 전자현미경으로, mitochondria는 가장 초기 변화로 기질내 과립의 감소 및 경미한 부종이 20분군에서부터 관찰되었으며 이 소견은 30분군에서 전반적으로 나타났다. 막 구조의 변화는 1시간 이후에 볼 수 있었으며 내막 및 cristae의 변성이 먼저 일어났고 외막의 파괴는 후에 관찰되었다. Mitochondria의 부종은 30분 이전에는 경미하였으나 막구조 이상이 생긴 1시간 이후는 매우 심한 종창이 형성되었으며 이러한 부종은 주로 기질내 부종이었으며 막사이의 간격은 심한 확장을 보이지 않았다.

기질내 무정형의 고밀도 구조물의 출현은 30분 이후 관찰되었으며, 막구조 변성후에는 더욱 밀도가 높은 물질의 침착도 관찰되었다. 기질내 과립의 소실은 경미한 부종과 함께 가장 초기에 관찰된 변화였다. 기질내 과립에 대해 Weiss⁴⁹는 sodium이나 potassium 등의 1가 양이온의 집적으로 관찰 보고하였으며, Peachy⁵⁰와 Greenwald 등⁵¹은 calcium이나 strontium 등의 2가 양이온의 집적장소로 보고하였다. Mitochondria에서 sodium이나 lithium 등을 제외한 대부분의 필요한 양이온들을 운반하는데 반드시 ATP가 필요하며^{52, 53} 특히 calcium이온은 기질내에서 phosphate와 결합하여 인산화합물(Ca₃(PO₄)₂)로 침착되며 이를 위해서 충분한 호흡작용과 ATP가 요구된다⁵⁴는 사실이 알려져 있다. Ischemia로 인한 세포상해시 ATP는 산소공급이 중단된 30분 이내에 원래의 30%이하로 감소한다는 보고가^{55, 56} 있으며 이러한 문헌적 고찰을 통해 granule의 소실은 mitochondria의 ATP 감소로 인한 양이온 운반의 장애로 나타나는 현상으로 추

측되어 진다.

Mitochondria의 부종은 본 실험에서 주로 기질내 부종으로 관찰되었으며 막간의 간격은 넓어지지 않았으나 막구조의 변성이 일어난 뒤에는 불규칙한 확장을 보이는 곳도 있었다. 초기의 막구조가 전전한 상태에서의 부종은 경미하여 기질의 구조가 유지되면서 부종과 함께 균등한 상대적인 전자밀도의 하강을 보였다. 이에 대한 기전은 sodium, potassium 등의 이온조절 장애^{18~20}나 pH의 감소⁵⁷등으로 설명되고 있으며 이온조절 장애는 ATP 감소와 유관한 변화로 생각할 수 있다. 아주 심한 기질내종창은 막구조의 변화와 함께 관찰되었으며 이러한 소견은 막구조의 파괴와 세포의 비가역적 변화의 상관관계를 보고한 연구들과^{23~25} 일치되는 소견으로 생각된다.

기질내 무정형 고밀도 구조물은 30분 군에서 관찰되었으며 막구조 변성 이후는 밀도가 훨씬 높고 형태가 다른 구조물의 출현도 같이 관찰되었다. 이와 유사한 구조물이 여러 연구보고들에서 이미 관찰되어 졌으며^{4, 16, 21, 22, 43, 57~63} 그 명칭은 amorphous matrix density^{4, 16, 22}, dense material⁴³, intramitochondrial dense sphere⁵⁷, dark body⁵⁸, electron dense deposit⁵⁹, electrondense floccular inclusion⁶¹, amorphous matrix dense body⁶², 혹은 amorphous flocculant density⁶³ 등으로 다양하며 그 성분 또한 아직 확실하게 밝혀져 있지 않다. 본 실험에서 관찰된 고밀도 구조물은 초기 cristae 및 내막을 중심으로 형성되어 있었으며 나중에 관찰된 좀더 밀도가 높은 물질은 막구조의 파괴 이후 관찰되었다. 다수의 보고자들은 이 물질의 구조를 calcium의 침착으로 설명하였으나^{43, 57~60}, Farber 등²⁵이 보고한 바로는 mitochondria내의 calcium이온 농도는 ischemia 3시간 후에도 그 양이 크게 증가하지 않음을 감안할 때 단순히 calcium의 침착만으로는 보기가 어렵다. 또한 구조상으로도 renal calcification을 유도한 연구⁴³에서 나타난 calcium의 결정체와 전자밀도나 모양이 달라 calcium의 구조물과 다른 것으로 생각된다. 따라서 30분군에서 관찰된 막구조를 중심으로한 고밀도 구조물은 기질 및 cristae 주변 단백질의 변성으로 생각하는 것이 타당하며 막구조 이상이 생긴 뒤 더욱 밀도가 높아진 구조물의 형성에는 단백질 변성 외에도 calcium 등의 이온이 관여할 것으로 사료되며 이와 유사한 구조가 Jennings 등⁴에 의해서 관찰된 바도 있다. 또한 Majno 등⁵은 ischemia 30분만에 단백질 변성이 관찰되었으나 이는 가역적인 변화로 ischemia를 제거한 뒤 소실되었다고 하였으며,

Aschraf⁵⁹⁾는 심장근육에 대한 실험에서 혈액공급 차단 후 생긴 기질내 응고물이 다시 산소를 재공급하면서 공급액에서 calcium 을 제거함으로써 응고물의 형성이 사라졌다고 보고하였다.

본 실험에서 관찰된 기질내 침착물은 상기한 바와같이 초기에 형성된 비교적 저밀도 물질은 그 구조가 cristae 를 가까이 하는 양상을 보이며 그러한 것은 나중까지 관찰되었으나 그 크기의 현저한 변화는 나타나지 않았다. 또한 막구조의 파괴 이후에 생긴 고밀도의 침착물은 cristae 와 무관하며 이는 훨씬 경계가 분명한 구조를 가지고 있었으나 이 역시 크기는 현저히 증가하지 않았다. 이러한 소견에서 초기의 침착물은 주로 cristae 및 내막구조를 중심으로 한 내막과 cristae 및 기질의 단백변성의 결과로 사료되며, 단백변성만으로는 상호 응집력에 한계가 있으며 세포내 효소에 의한 분해작용등으로 그 크기가 현저히 증가할 수 없다고 보여지며 좀더 밀도가 높은 침착물은 전자에 생긴 단백변성 부위가 핵이 되어 여기에 calcium 등의 이온이 침착되어 훨씬 두껍한 침착물을 형성하였을 것으로 추측된다. 그 크기에 대해서는 본 실험과 같이 그 조건이 자가용해인 경우 외부의 다른 이온 특히 calcium 이온의 침가가 다른 생체내에서의 실험에서 처럼 크기가 자랄 수는 없다고 생각된다. 그러므로 막변화가 동반되지 않는 기질내 응고물은 반드시 비가역적 변화의 증거로 볼 수 없으며 막변화이후 나타난 고밀도 응고물은 비가역적 변화를 의미하는 소견으로 보여진다. 그러나 이들의 형성에 대한 기전 및 정확한 생화학적 구조와 성분에는 대해서는 더 많은 연구가 있어야 될 것으로 생각한다.

요 약

저자들은 간세포 자가용해시의 변화를 미토콘드리아를 중심으로 관찰하기 위해 체중 140~160 gm 의 Sprague-Dawley 계 숫쥐를 도살하여 간 조직편을 절제하여 37°C 무균 생리식염수하에 방치하고 10분, 20분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간 12시간 및 24시간 후에 각각을 고정하여 광학현미경 및 전자현미경적 검색을 실시하였다.

광학현미경으로는 경미한 세포질내 변화가 1시간 이후 부터 관찰되었으며 세포막의 변화는 3시간 이후 약 간씩 나타났다. 핵은 3시간이후 경미한 변화를 일으켰으나 세포질내의 미세구조에 대한 변화는 광학현미경 상으로 인지할 수 없으며 24시간까지 원래의 방사상의

선상구조가 유지되며 세포의 경제도 잘 유지된 것으로 나타났다.

전자현미경적 소견은 20분군에서 경미한 기질내 부종과 더불어 기질내 과립의 수가 감소되었으며 1시간 이후 막의 손상이 나타나면서 미토콘드리아의 기질은 high-amplitude swelling 을 보였다. 막의 변화는 내막과 cristae 에서 먼저 관찰되었으며 외막의 파괴는 3시간후 부터 관찰되었다.

기질내 부정형 고밀도 침착물은 막변화가 형태학적으로 인지되지 않은 30분부터 관찰되었으며 이 물질은 30분군 이후 더오래 방치한 실험군들에서도 관찰되었다. 막구조가 파괴된 1시간 이후부터 더욱 밀도가 높은 침착물이 발견되었다.

이상의 성적으로 보아 미토콘드리아의 기질내 과립의 소실이 자가용해로 인한 가장 초기의 변화이며, 미토콘드리아의 비가역적인 손상은 막구조 이상으로 야기된다고 사료되며 기질내 고밀도 물질이 두가지의 다른 모양으로 출현하는 것은 매우 흥미로운 현상으로 생각되며 이의 생성기전 및 화학적 성분에 대해서는 더욱 연구되어야 할 과제로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Brunson JG, Gall EA: *Concepts of disease. 1st edition. New York, Macmillan, 1971, p56*
- 2) Robbins SL, Cotran RS, Kumar V: *Pathologic basis of disease. 3rd edition. Philadelphia, WB Saunders, 1984, p 2*
- 3) Osvaldo L, Jackson JD, Cook ML, Latta H: *Reaction of kidney cell during autolysis. Light microscopic observations. Lab Invest 14:603, 1965*
- 4) Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA: *Ischemic tissue injury. Am J Pathol 81:179, 1975*
- 5) Majno G, LaGattuta M, Thompson TE: *Cellular death and necrosis; Chemical, physical and morphologic changes in rat liver. Virchow Arch Pathol Anat 333:421, 1960*
- 6) Emmel VM: *Mitochondrial and pH changes in the rat's kidney following interruption and restoration of the renal circulation. Anat Rec 78:361, 1940*
- 7) Loiselle JM, Denstedt OF: *Biochemical changes during acute physiological failure in rat. II*

- Behavior of adenine and pyridine nucleotides of the liver during shock. Canad J Biochem* 42:21, 1964
- 8) Michael G, Beuren A, Hogencamp CE, Bing RJ: *Effect of interruption of coronary circulation on metabolism of the arrested heart. Am J Physiol* 195:417, 1958
 - 9) Moore KE, Brode TM: *Functional changes in liver mitochondria following in situ anoxia. Am J Physiol* 198:677, 1960
 - 10) Meyer DK, Purdy FA: *Cardiac glycogen of rats during and following acute anoxia. Am J Physiol* 200:860, 1961
 - 11) Feinstein MB: *Effects of experimental congestive heart failure, ouabain and asphyxia on the high energy phosphate and creatine content of the guinea pig heart. Circul at Res* 10:333, 1962
 - 12) Busch EW, Habel G, Wichert PV: *Restitution von Adenosinphosphaten im Lebergewebe während der Weiderdurchblutung nach ischämischen Belastungen bis zu 5std. Dauer Biochem Z* 341:85, 1964
 - 13) Klionsky B: *Myocardial Ischaemia and early infarction. A histochemical study. Am J Pathol* 36:575, 1960
 - 14) Harman JW: *Studies on mitochondria. II The structure of the mitochondria in relation to enzymatic activity. Exp Cell Res* 1:394, 1950
 - 15) Bassi M, Bernelli-Zazzera A: *Ultrastructural cytoplasmic changes of liver cells after reversible and irreversible ischaemia. Exp Mol Pathol* 3:332, 1964
 - 16) Ginn FL, Shelburne JD, Trump BF: *Disorders of cell volume regulation. I Effects of inhibition of plasma membrane adenosine triphosphatase with ouabain. Am J Pathol* 53:1041, 1968
 - 17) Saladino AJ, Trump BF: *Ion movements in cell injury. Effects of inhibition of respiration and glycolysis on the ultrastructure and function of the epithelial cells of the toad bladder. Am J Pathol* 52:737, 1968
 - 18) Saladino AJ, Bentley PJ, Trump BF: *Ion movements in cell injury; Effect of amphotericin B on the ultrastructure and function of the epithelial cells of the toad bladder. Am J Pathol* 54:421, 1969
 - 19) Croker B, Saladino AJ: *Effects of inhibition of energy metabolism on the structure and function of toad bladder epithelial cells. Fed Proc* 28:619, 1969
 - 20) Croker BP, Saladino AJ, Trump BF: *Ion movements in cell injury; Relationship between exergy metabolism and the pathogenesis of lethal injury in the toad bladder. Am J Pathol* 59:247, 1970
 - 21) Jennings RB, Reimer KA: *Lethal myocardial ischemic injury. Arch Pathol* 79:135, 1965
 - 22) Jennings RB, Reimer KA: *Lethal myocardial ischemic injury. Am J Pathol* 102:241, 1968
 - 23) Chien KR, Abrams J, Serroni A, Marthin JT, Farber JL: *Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible ischemic liver cell injury. J Biol Chem* 253:4809, 1978
 - 24) Mitnacht S, Sherman SC, Farber JL: *Reversal of ischemic mitochondrial dysfunction. J Biol Chem* 254:9871, 1979
 - 25) Farber JL, Chien KR, Mitnacht S: *The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. Am J Pathol* 102:271, 1981
 - 26) Altman R: *Die Elementorganismen und ihre Beziehungen zur den Zellen. Leipzig, Veit, 1980, p 12*
 - 27) Benda C: *Weitere Mitteilungen über die Mitochondria. Berlin, Verh Physiol Ges, 1898, p376*
 - 28) Michelis L: *Die vitale Färbung, eine Darstellungsmethode der Zellgrana. Arch Mikrosk Anat* 55:558, 1900
 - 29) Bensley RR, Hoerr NL: *Studies on cell structure. VI The preparation and properties of mitochondria. Anat Rec* 60:251, 1934
 - 30) Hogeboom GH, Schneider WC, Palade GE: *Cytochemical studies of mammalian tissue. I Isolation of intact mitochondria from rat liver; Some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J Biol Chem* 172:619, 1948
 - 31) Claude A: *Fractionation of mammalian liver*

- cells by differential centrifugation. II Experimental procedures and results. *J Exp Med* 84: 61, 1946
- 32) Palade GE: An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1:188, 1953
- 33) Pearse AGE, Scarpelli DG: Intramitochondrial localization of oxidative enzyme systems. *Exp Cell Res (Suppl)* 7:50, 1959
- 34) Seligman AM, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JS: Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine(DAB). *J Cell Biol* 38:1, 1968
- 35) Luft JH: Improvement in embedding method. *J Biophys Biochem Cytol* 9:409, 1961
- 36) Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208, 1963
- 37) Stowell RE, Lee CS: Histochemical studies of mouse liver after single feeding of carbon tetrachloride. *Arch Pathol* 50:519, 1950
- 38) Recknagel RO, Anthony DD: Biochemical changes in carbon tetrachloride fatty liver; Separation of fatty changes from mitochondrial degeneration. *J Biol Chem* 234:1052, 1959
- 39) Recknagel RO, Lombardi B: Studies of biochemical changes in subcellular particles of rat liver and their relationship to a new hypothesis regarding the pathogenesis of carbontetrachloride fat accumulation. *J Biol Chem* 236:564, 1961
- 40) Ashworth CT, Luibel FJ, Sanders E, Arnold N: Hepatic cell degeneration; Correlation of fine structural with chemical and histochemical changes in hepatic cell injury produced by carbon tetrachloride in rats. *Arch Pathol* 75: 212, 1963
- 41) Chernick SS, Moe JG, Ronan GP, Schwarz K: A metabolic lesion in dietary necrotic liver degeneration by intraportal tocopherols. *J Biol Chem* 221:231, 1956
- 42) Rosecan M, Rodnan GP, Chernick SS, Schwarz K: Acetate-2-C utilization in dietary necrotic liver degeneration. *J Biol Chem* 217:967, 1955
- 43) Svoboda DJ, Higginson J: Ultrastructural hepatic changes in rats on a necrogenic diet. *Am J Pathol* 43:477, 1963
- 44) Wilson JW, Leduc EH: Mitochondrial changes in liver of fatty acid deficient mice. *J Cell Boil* 16:281, 1963
- 45) Berenbom M, Chang PI, Stowell RE: Changes in mouse liver necrosis in vitro. *Lab Invest* 4:315, 1955
- 46) Chang JP, Stowell RE, Betz HE, Berenbom M: Histochemical studies of necrosis of mouse liver in vitro. *Arch Pathol* 65:479, 1958
- 47) Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE: An electron microscopic study of early cytoplasmic alterations in hepatic parenchymal cells of mouse liver during necrosis in vitro(Autolysis) *Lab Invest* 11:986, 1962
- 48) Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE: Studies on necrosis of mouse liver in vitro; Ultrastructural alterations in the mitochondria of hepatic parenchymal cells. *Lab Invest* 14:343, 1965
- 49) Weiss JM: Mitochondrial changes induced by potassium and sodium in the duodenal absorptive cell as studied with the electron microscope. *J Exp Med* 102:783, 1955
- 50) Peachey L: Electron microscopic observations on the accumulation of divalent cations in intramitochondrial granules. *J Cell Biol* 20: 95, 1964
- 51) Greenwald JW, Rossi CS, Lehninger AL: Effect of active accumulation of calcium mitochondria. *J Cell Biol* 23:21, 1964
- 52) Lehninger AL, Carafoli E, Rossi CS: Energy linked ion movements in mitochondria. *Adv Enzymol* 29:259, 1967
- 53) Tzagoloff A: *Mitochondria*. New York, Plenum, 1982, p 224
- 54) Vaslington FD, Murphy JV: Active binding of calcium by mitochondria. *Fed Proc* 20:146, 1961
- 55) Nayler WG: The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol* 102:262, 1981
- 56) Vogt MT, Farber E: On the molecular patho-

- logy of ischemic renal cell death; Reversible and irreversible cellular and mitochondrial metabolic alterations. *Am J Pathol* 53:1, 1968
- 57) Caulfield JB, Sohrag PE: *Electron microscopic study of renal calcification. Am J Pathol* 44: 365, 1964
- 58) Caulfield JB, Klionsky B: *Myocardial ischemia and early infarction; An electron microscopic study. Am J Pathol* 90:423, 1978
- 59) Ashraf M, White F, Bloor CM: *Ultrastructural influence of reperfusing dog myocardium with calcium-free blood after coronary artery occlusion. Am J Pathol* 90:423, 1978
- 60) Kawamura K, Cowley MJ, Karp RB, Mantle JA, Logic JR, Rogers WJ, Russell R Jr, Rackley CE, Tames TN: *Intramitochondrial inclusions in the myocardial cells of human hearts and coronary disease. J Mol Cell Cardiol* 10:797, 1978
- 61) Umemura T, Slinger SJ, Bhatnagar MK, Yamashiro S: *Histopathology of the heart from rats fed rapeseed oils. Res Vet Sci* 25:318, 1978
- 62) Klomer RA, Fishbein MC, Hare CM, Maroko PR: *Early ischemic ultrastructural and histochemical alterations in the myocardium of the rat following coronary artery occlusion. Exp Mol Pathol* 30:129, 1979
- 63) Schiaffino S, Severin E, Hanzlikova V: *Intermembrane inclusions induced by anoxia in heart and skeletal muscle mitochondria. Virchow Arch (Cell Pathol)* 31:169, 1979

=Abstract=

Ultrastructural Changes of Liver Cell Mitochondria in Autolysis

Yoon Kyung Sohn, M.D., Il Hoon Kwon, M.D.
and Tae Joong Sohn, M.D.

Department of Pathology, Kyungpook National University, Taegu, Korea

The authors studied the ultrastructural changes

of liver cell mitochondria in autolysis. The male Sprague-Dawley rats, weighing 140~160 gm were sacrificed for extract liver tissue. The slices of the liver tissue were incubated in 37°C aseptic normal saline, and those were examined by following intervals; 10, 20 and 30 minutes and 1, 2, 6, 12 and 24 hours with light and electron microscope.

The results obtained by light microscopy were summarized as follow. Several fine intracytoplasmic vacuoles were observed 1 hour after incubation. After 3 hours, focal destruction of cytoplasmic membrane with pyknosis of nuclei were observed. More delicate intracytoplasmic architectural changes could not be detected at light microscopic studies. The cord arrangement and cellular boundaries were relatively well preserved until 24 hours after incubation.

Electronmicroscopically, mild intramitochondrial swelling with diminution of intramitochondrial granules were observed at 20 minutes. These were the earliest findings. Both high amplitude swelling and destruction of mitochondrial membrane were observed concurrently at 1 hour after incubation. The earlier membrane changes were observed at inner membrane with cristae and followed by degeneration of the outer membrane. The intramitochondrial amorphous dense deposits were observed at 30 minutes when the membranes were not destroyed. These deposits were noted in the other experimental groups which were incubated longer than 30 minutes. More electron dense deposits were observed after 1 hour at that time the membrane changes appeared.

The results suggest in this experiment that the earliest autolytic changes of liver cell mitochondria is loss of intramitochondrial granules and the membranous changes led to the irreversible mitochondrial injury. The appearance of two types of intramitochondrial dense deposits would be an interesting finding needed to require further investigation for the chemical structure and mechanism of dense deposit formation.

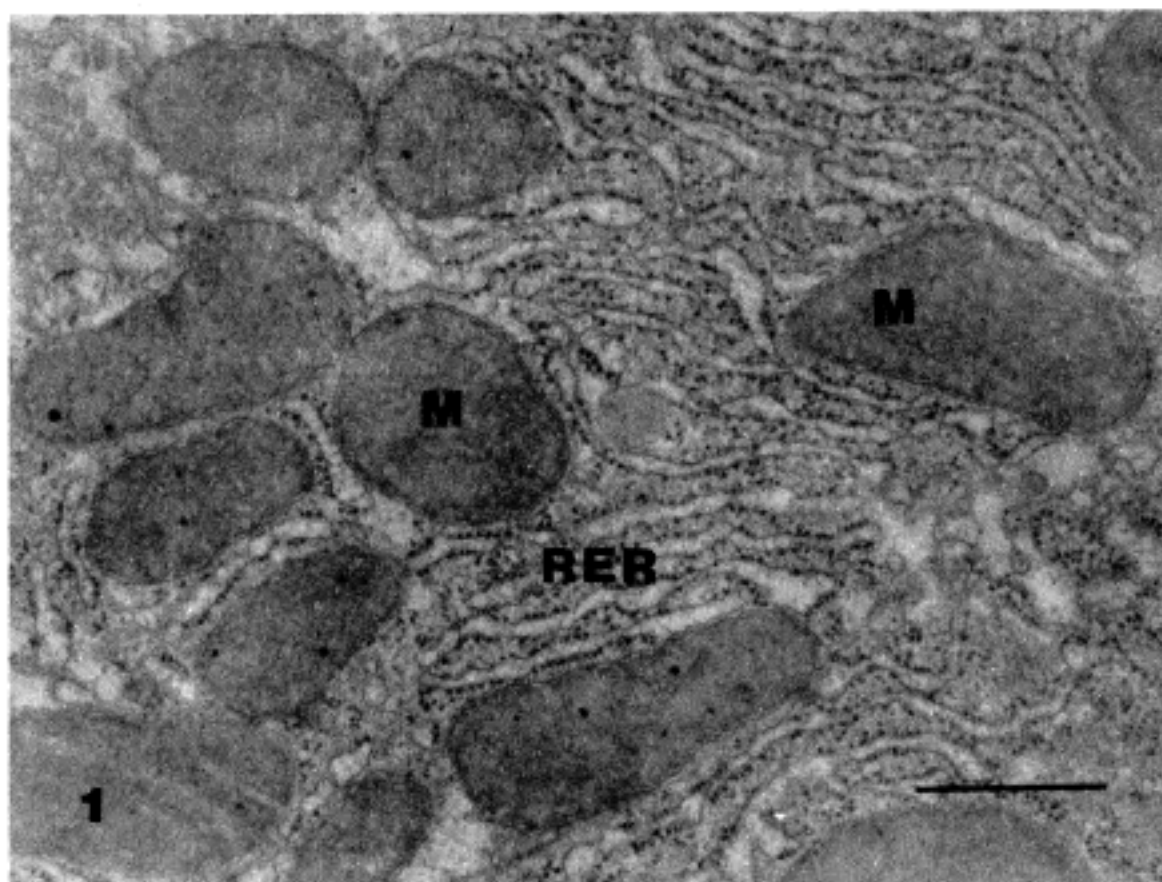


Fig. 1. Hepatocyte, rat, control. The mitochondria(M) show several dark granules in matrix. Lamellated rough endoplasmic reticulum(RER) is present. Bar is $1\mu\text{m}$.

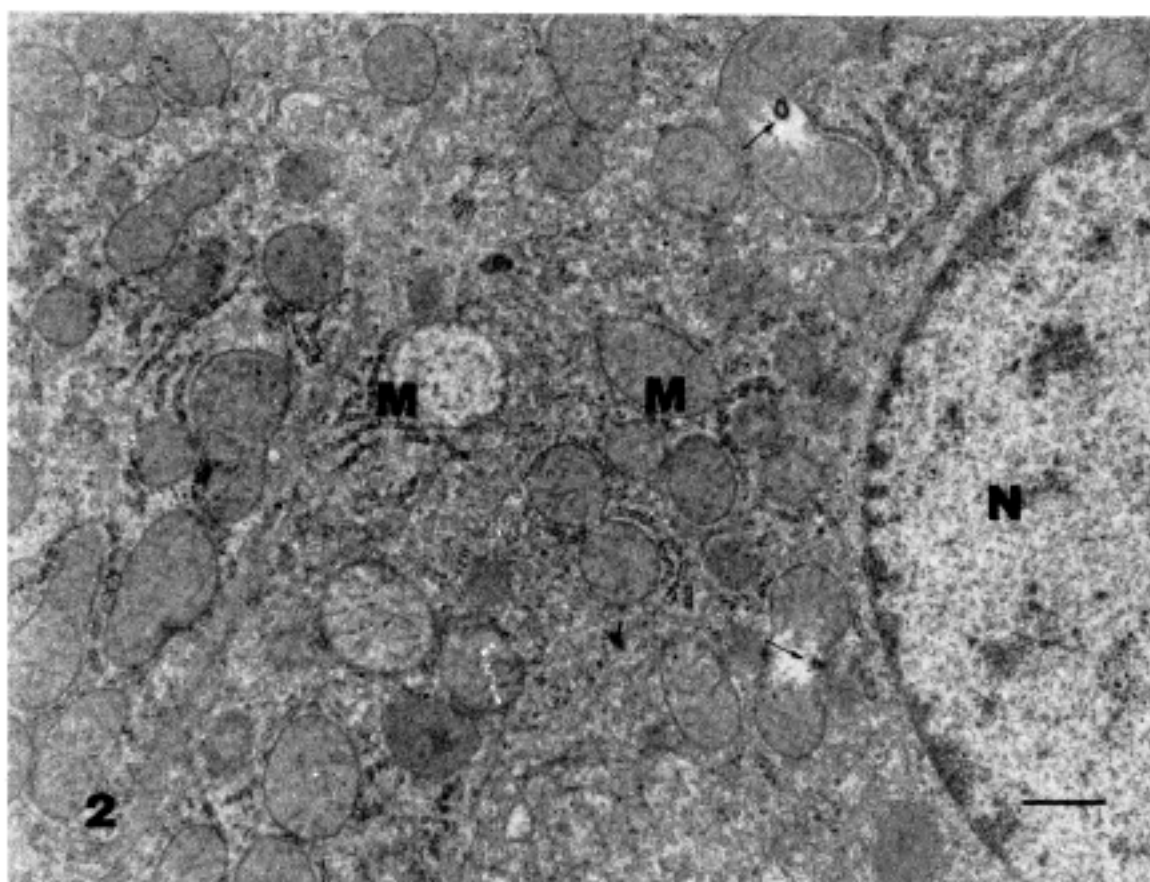


Fig. 2. Hepatocyte, rat, 20 minutes incubation. Low amplitude swelling of mitochondria(M) is seen. Loss of granule is also present. Myeline figure (arrow) is formed. Nuclear(N) change is not noted. Bar is $1\mu\text{m}$.

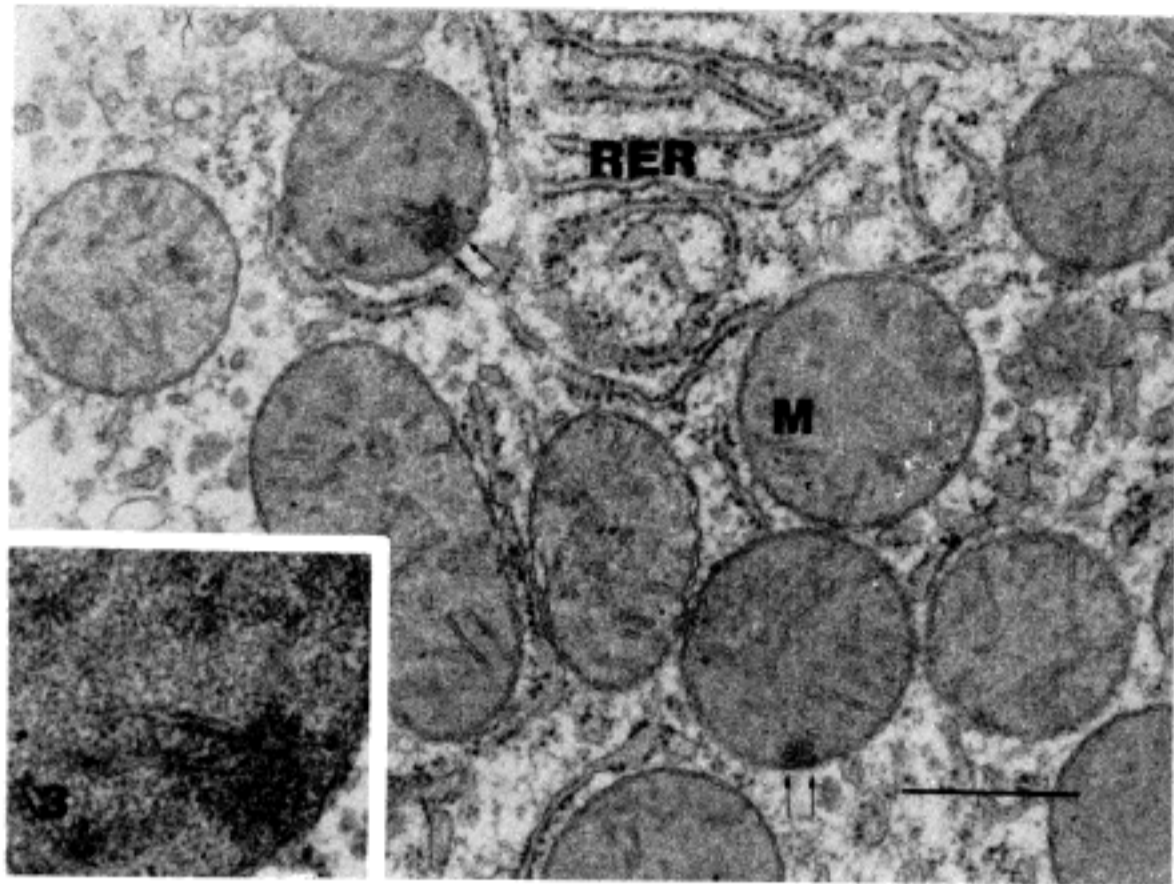


Fig. 3. Hepatocyte, rat, 30 minutes incubation. Amorphous dense deposits (double arrows) are formed. Close relationship with cristae is noted (inset). Bar is $1\mu\text{m}$.

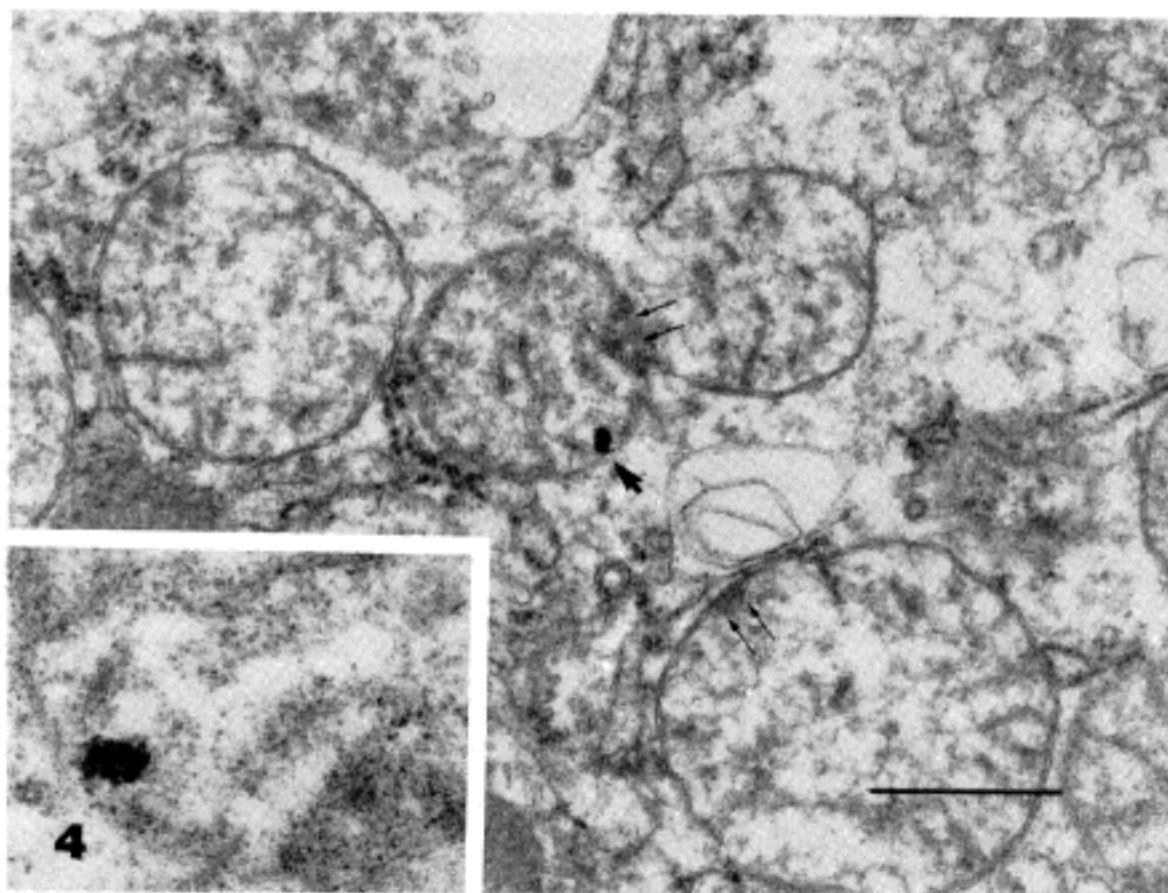


Fig. 4. Hepatocyte, rat, 1 hour incubation. High amplitude swelling of mitochondria is seen. Marked intracytoplasmic swelling is noted. Similar deposits seen in Fig. 3. (double arrows) are formed. The darker one (single arrow) is magnified (inset). It reveals more granular feature. Bar is $1\mu\text{m}$.

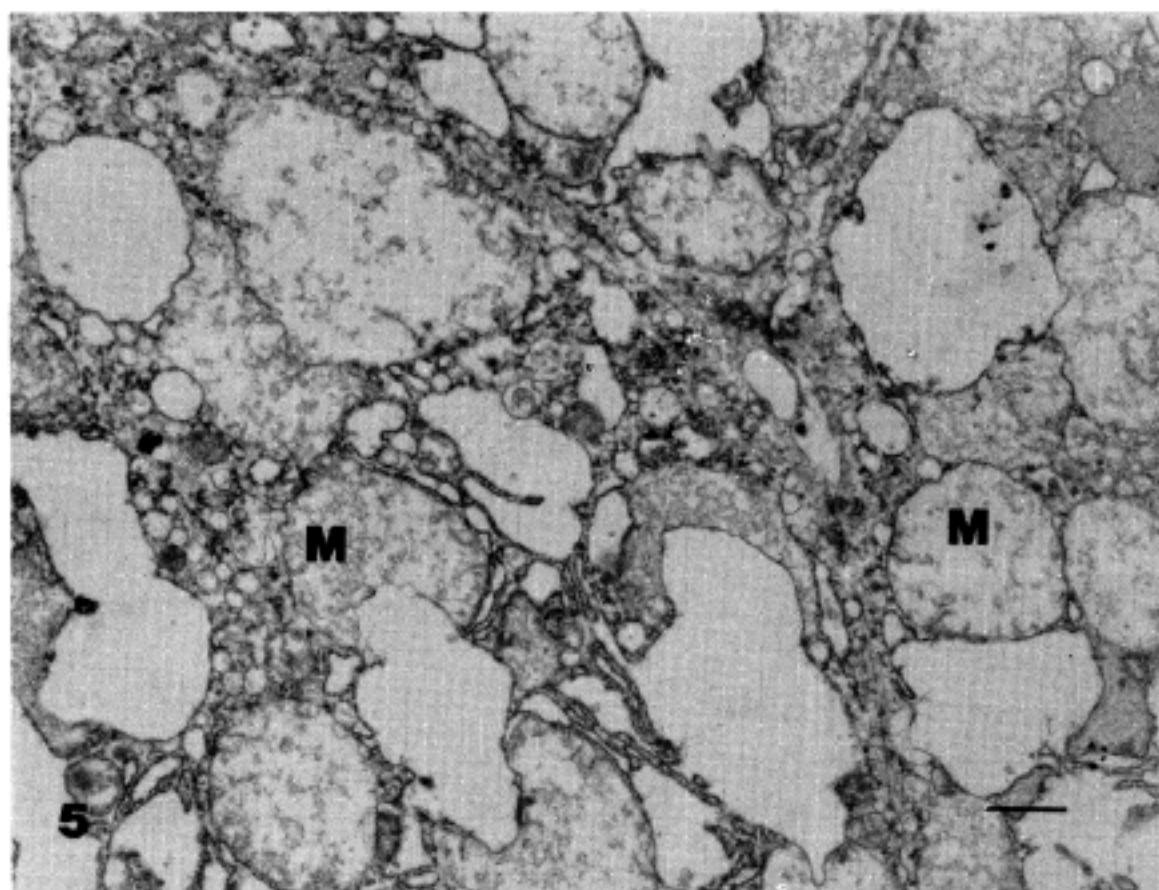


Fig. 5. Hepatocytes, rat, 3 hours incubation. High amplitude swelling of mitochondria(M) is noted. Their configuration is distorted. Bar is 1 μ m.

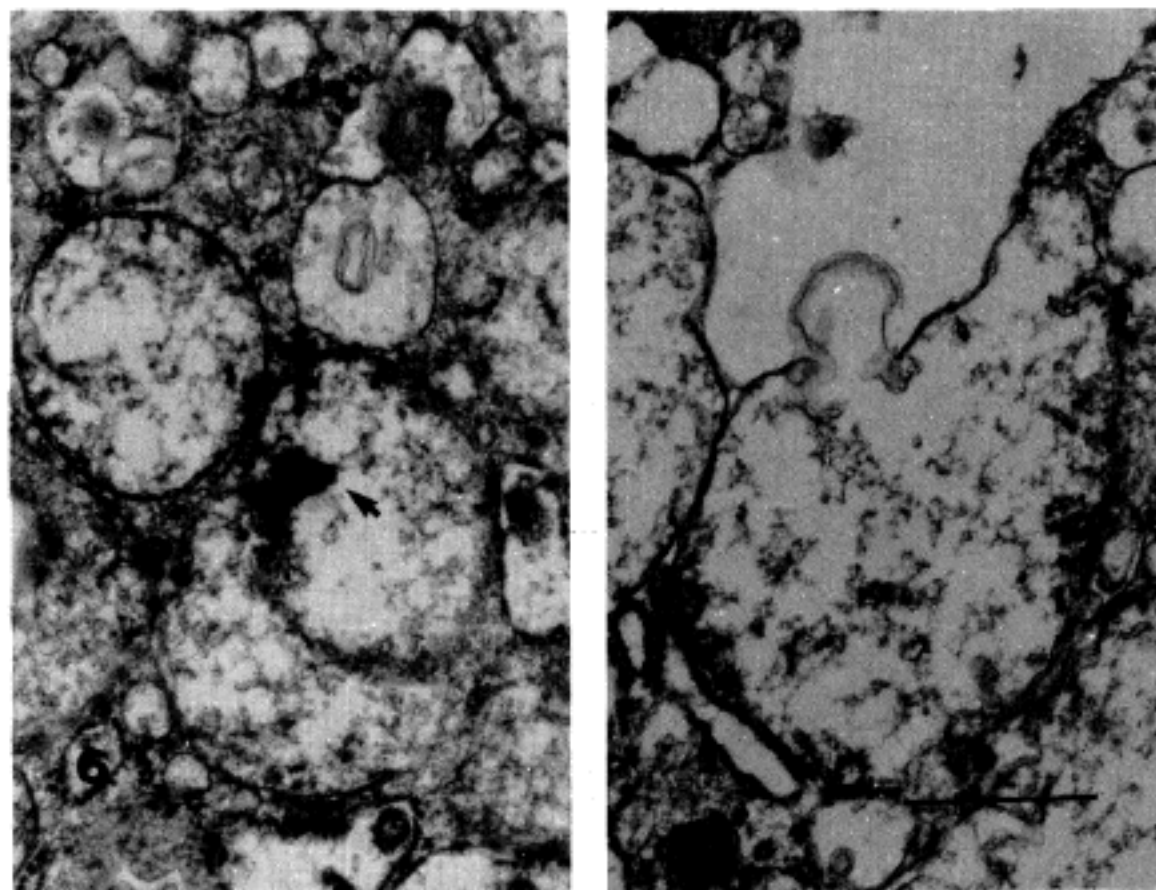


Fig. 6. Hepatocyte, rat, 3 hours incubation. Dense matrix deposit (arrow) formation with destruction of cristae is present (left). Destruction of membrane structure is also noted (right). Bar is 1 μ m.

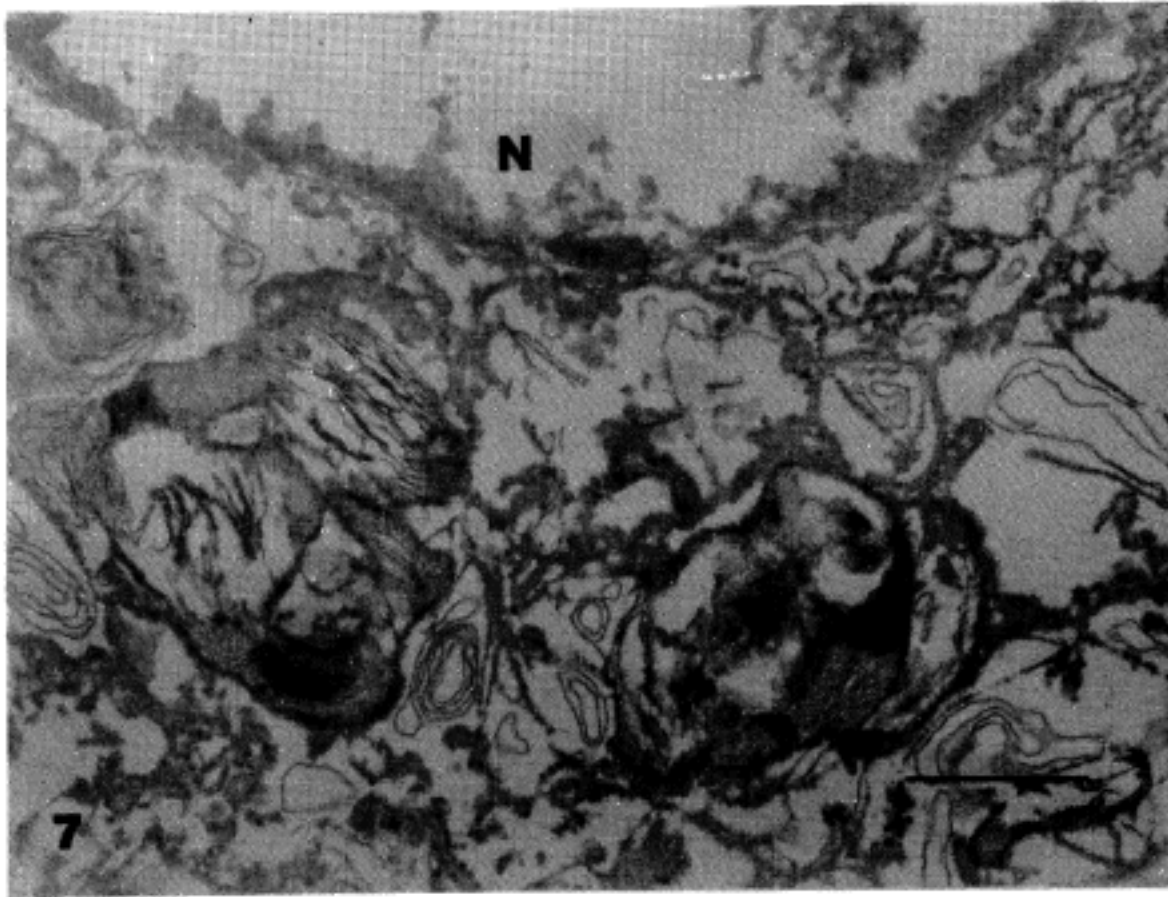


Fig. 7. Hepatocyte, rat, 24 hours incubation. Intracytoplasmic architecture is completely destroyed. The nucleus (N) shows peripherally aggregated chromatin with vacuolization of nucleoplasm. Bar is $1\mu\text{m}$.

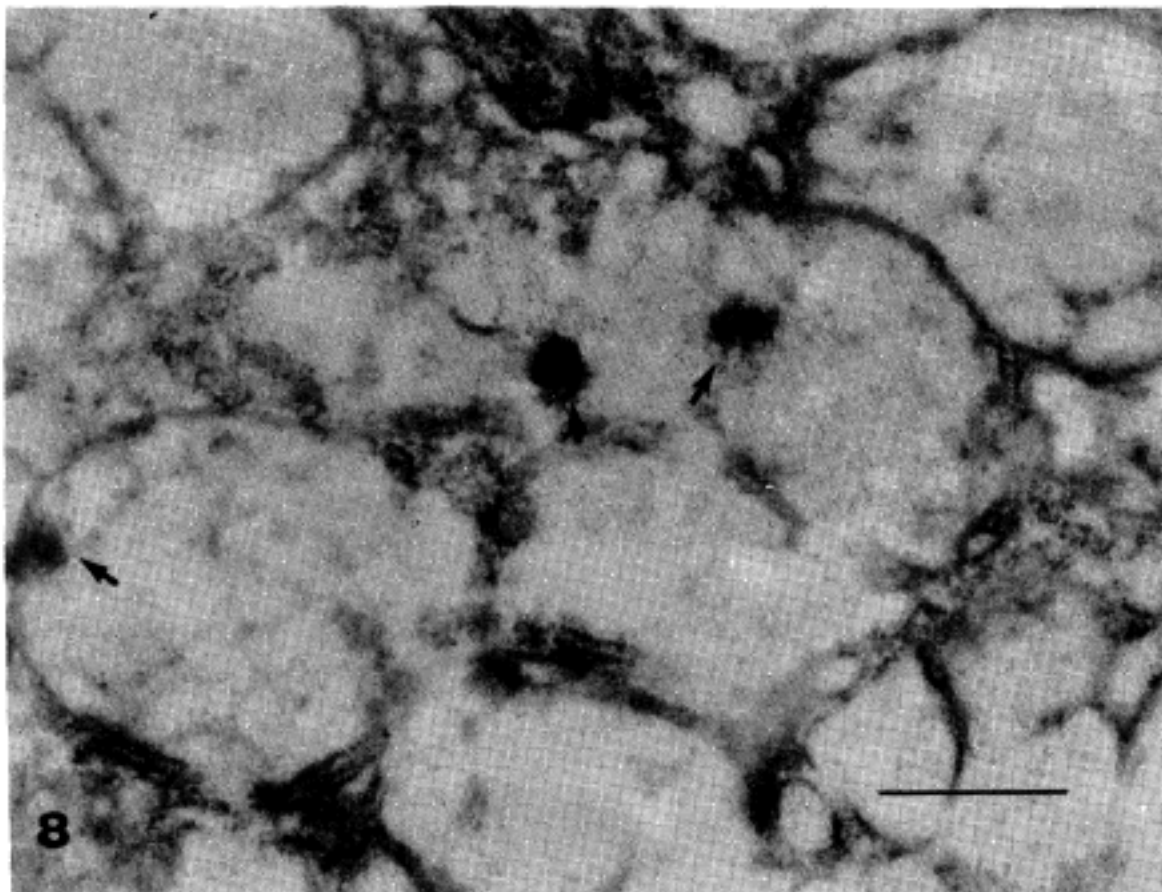


Fig. 8. Hepatocyte, rat, 24 hours incubation. Two mitochondrial images show marked distortion and complete loss of identifying landmarks. Dense matrix deposit (arrow) with fuzzy border is present. Bar is $1\mu\text{m}$.